

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ IL1B, IL6, IL10, TNFA И ФАКТОРА РОСТА VEGF В КАЧЕСТВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ РИСКА РАЗВИТИЯ ОСТЕОПОРОЗА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

В.И. КОНЕНКОВ¹, А.В. ШЕВЧЕНКО², М.А. КОРОЛЕВ^{3*}, С.А. ЛАПСИНА⁴, Е.В. ЗОНОВА⁵, В.Ф. ПРОКОФЬЕВ⁶, Н.Б. ОРЛОВ⁷, О.В. ГОЛОВАНОВА⁸, Е.А. КОРОЛЕВА⁹

¹ директор НИИКЭЛ СО РАМН, заведующий лабораторией клинической иммуногенетики, академик РАМН, д.м.н., профессор;

² старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики НИИКЭЛ СО РАМН, к.м.н.;

³ заместитель директора НИИКЭЛ СО РАМН, к.м.н.;

⁴ врач-эндокринолог клиники НИИКЭЛ СО РАМН;

⁵ заведующая отделением терапии клиники НИИКЭЛ СО РАМН, к.м.н.;

⁶ ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики НИИКЭЛ СО РАМН, к.м.н.;

⁷ старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики НИИКЭЛ СО РАМН, к.м.н.;

⁸ старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики НИИКЭЛ СО РАМН, к.м.н.;

⁹ ассистент кафедры эндокринологии ГОУ ВПО НГМУ Росздрава

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии Сибирского отделения РАМН, г. Новосибирск; лаборатория клинической иммуногенетики (директор – академик РАМН В.И. Коненков); ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава, кафедра эндокринологии (ректор – профессор, д.м.н. И.О. Маринкин)

Цель исследования. Комплексный анализ прогностической значимости выявления аллельных вариантов промоторных участков генов цитокинов в качестве генетических факторов риска развития остеопороза при сахарном диабете 2 типа.

Материалы и методы. Было обследовано 625 человек. Контрольную группу составили 375 здоровых женщин без признаков остеопороза и сахарного диабета. С целью оценки роли генетических факторов при остеопорозе обследовано 250 женщин находящихся в постменопаузальном периоде, разделенные на 3 группы: первая группа - 38 пациенток с первичным остеопорозом, вторая - 82 пациентки с остеопорозом на фоне сахарного диабета 2 типа, третья группа - 130 пациенток с сахарным диабетом 2 типа без признаков остеопороза. Группы были сравнимы по возрасту. Исследовались восемь полиморфизмов, локализованных в промоторных регионах генов интерлейкинов: TNFA в позициях C-863A, G-308A, G-238A, IL-1B T-31C, IL-4 C-590T, IL-6 G-174C, IL-10 C-592A, VEGFA C-2578A. Анализ исследуемых полиморфизмов проводился с использованием метода рестрикционного анализа продуктов амплификации.

Результаты. Нами установлено, что наличие остеопороза является дискриминирующим фактором, разделяющим группу пациенток с сахарным диабетом по целому ряду генетических признаков. Группу этих признаков составили комбинации из 3-х, 4-х, 5-ти и 6-ти генотипов генов цитокинов: TNFA, IL-6, IL-1B, VEGF и IL-10. В группах больных сахарным диабетом 2 типа были проанализированы параметры, характеризующие инсулинорезистентность, эндотелиальную дисфункцию и воспаление. У пациентов страдающих сахарным диабетом и остеопорозом отмечено достоверное повышение концентраций C-пептида, GLP-1 и снижение содержания GIP, лептина, PAI-1 и висфатина. В данной работе впервые описана ассоциированность уровней инсулина, резистина, лептина, глюкозона и PAI-1 с генотипами цитокинов при сахарном диабете 2 типа.

Заключение. В результате исследования установлена связь развития системного остеопороза у здоровых женщин в постменопаузе и у пациенток с сахарным диабетом 2 типа с наличием определенными комбинациями аллельных вариантов генов цитокинов.

Ключевые слова: остеопороз, сахарный диабет 2 типа, гены цитокинов.



ВВЕДЕНИЕ. Согласно установившемуся мнению остеопороз (ОП) является типичным представителем мультифакториального заболевания, в патогенезе которого, наряду со многими средовыми воздействиями, большое значение имеют генетические факторы риска. Однако, как правило, мы имеем дело с остеопорозом, развившимся на фоне предварительно имеющейся патологии, возникновение которой связано со своими факторами генетической предрасположенности. Одним из таких заболеваний является сахарный диабет 2 типа (СД2). И здесь мы по сути дела имеем дело не только с самостоятельными генетическими факторами риска развития остеопороза, сколько с факторами ускоренного темпа его развития на фоне предшествующей патологии.

Для исследования генетики остеопороза характерен выбор генов, продукты которых принимают непосредственное участие в процессах ремоделирования костной ткани [5, 27]. Значимое место в этих сообщениях занимают и гены

цитокинов, как признание того факта, что основное место в костном ремоделировании занимают процессы остеокласт-зависимой костной резорбции, связанной с повышенной клеточной адгезией между остеокластными предшественниками и костномозговыми стромальными клетками или остеобластами. В генетике остеопороза развивающегося на фоне сахарного диабета 2 типа и его осложнений генам цитокинов также отводится важное место [40, 23]. Тем не менее, вопрос взаимосвязи остеопороза и сахарного диабета 2 типа в настоящий момент находятся в стадии разработки.

В последние годы проведен ряд генетических исследований, связанных с анализом полиморфизма генов целого ряда цитокинов, участвующих в ремоделировании костной ткани. Исследован последовательно полиморфизм гена IL-6 [22], гена рецептора TNFRSF1B [39] и самого гена TNFA [24], гена TGFB1[44], IL-1B, IL-10 [16] и т.п. Эти исследования

выявили ряд ассоциаций проанализированных полиморфизмов, как с развитием остеопороза, так и с показателями минеральной плотности кости в различных европеоидных и монголоидных популяциях. Несмотря на установление ряда, статистически значимых связей между анализируемыми признаками, они носили популяционный, скорее познавательный характер и не могли быть использованы в практической ревматологии в качестве самостоятельных или дополнительных лабораторных признаков. Все они обладали предельно низкими значениями различий (OR) в частоте встречаемости в группах пациентов с наличием или отсутствием остеопороза, что приводило к соответственно низким показателям чувствительности, специфичности, безошибочности, информативности и другим показателям, которые позволяли бы использовать их в качестве истинных биологических маркеров индивидуального прогноза выявления лиц с генетической предрасположенностью к развитию остеопороза.

Исходя из имеющегося в нашем коллективе опыта работы с генетическими прогностическими показателями в ревматологии, мы решили не использовать анализ ассоциированности отдельных полиморфизмов генов цитокинов с наличием остеопороза, а проанализировать частоты выявления комплексных генетических признаков, включающих в себя целый ряд отдельных генотипов цитокинов, выявляемых одновременно в геноме каждого обследованного пациента [6].

Вторым существенным отличием проведенного нами исследования, явилось использование для генетического анализа полиморфных участков генов цитокинов, расположенных в регуляторных, промоторных участках соответствующих генов, связанных с регуляцией уровня продукции самих цитокинов клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Всего было обследовано 625 человек. Из них 375 человек составили контрольную группу здоровых женщин без признаков остеопороза и сахарного диабета пожилого возраста (средний возраст $62 \pm 6,56$ лет). С целью оценки роли генетических факторов при остеопорозе обследовано 250 женщин в возрасте старше 50 лет, находящихся в постменопаузальном периоде, разделенные на 3 группы: в первую группу рандомизировано 38 пациенток с первичным остеопорозом, во вторую - 82 пациентки с остеопорозом на фоне ранее верифицированного сахарного диабета 2 типа, в 3-ю группу - 130 пациенток с сахарным диабетом 2 типа без признаков остеопороза. Группы были сравнимы по возрасту. Все женщины дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом НИИКЭЛ СО РАМН.

Минеральная плотность кости (МПК) поясничного отдела позвоночника (в передне-задней проекции) и проксимального отдела одной из бедренных костей определялась с помощью двуэнергетической рентгеновской абсорбциометрии. Измерение проводилось на аппарате «Lunar Prodigy» (США). Результаты измерений выражали в абсолютных значениях МПК (г/см^2) и в виде Т-критерия, согласно общепринятым критериям диагностики остеопороза (ВОЗ, 1994; ISCD, 2007). Остеопороз диагностировали при снижении МПК более чем на $-2,5$ стандартных отклонения от пиковой МПК женщин молодого возраста. Патологических переломов в анамнезе у пациенток не было. У всех обследованных были исключены другие заболевания или регулярный приём лекарственных средств, ведущие к снижению костной массы. Все женщины относились к одной социально-экономической группе (по характеру питания, экономическим показателям, жилищно-бытовым условиям и т.д.), а также не имели профессиональных вредностей. Больным каждой группы проведены денситометрические исследования.

В первой группе средний возраст пациенток составил $64,16 \pm 5,75$ лет, МПК $0,78 \pm 0,15$ г/см^2 , Т-критерий $-2,76 \pm 0,61$ SD. Во второй группе средний возраст пациенток составил $68,18 \pm 6,30$ лет, МПК $0,76 \pm 0,16$ г/см^2 , Т-критерий $-2,82 \pm 0,13$ SD. В третьей группе — средний возраст пациенток $65,02 \pm 8,00$ года, МПК $1,07 \pm 0,18$ г/см^2 , Т-критерий $-0,55 \pm 1,19$ SD.

Геномную ДНК выделяли из ядродержащих клеток 100 мкл периферической крови при помощи набора реагентов производства ООО «Лаборатория Медиген» (г. Новосибирск). Исследовались восемь полиморфизмов, локализованных в промоторных регионах генов интерлейкинов (IL): TNFA в позициях C-863A, G-308A, G-238A, IL-1B T-31C, IL-4 C-590T, IL-6 G-174C, IL-10 C-592A, VEGFA C-2578A. Анализ исследуемых полиморфизмов проводился с использованием метода рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ). Амплификация специфических участков генома проводилась с использованием праймеров и параметров температурных циклов, описанных в литературе: TNFA [12, 37, 30]; IL-1B [45]; IL-4 [17, 18]; IL-6 [21]; IL-10 [33]; VEGFA C-2578A [13]. Продукты амплификации подвергались рестрикции соответствующими эндонуклеазами: в случае генотипирования полиморфизма TNFA C-863A - Bst BAI, TNFA G-308A - Bsp19 I, TNFA G-238A - Msp I, IL-1B T-31C - Alu I, IL-4 C-590T - Bme 18 I, IL-6 G-174C - SfaN I, IL-10 C-592A - RsaI, VEGFA C-2578A - Bgl II («СибЭнзим», Новосибирск). Гидролиз продуктов амплификации проводили в течение 12 часов при оптимальной для фермента температуре. Продукты рестрикции разделяли с помощью электрофореза в 2% -3% агарозном геле. В качестве маркера фрагментов ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («СибЭнзим», Новосибирск).

В сыворотке крови больных одновременно определялось содержание 12 биомаркеров инсулинорезистентности — инсулина, С-пептида, висфатина, резестина, лептина, глюкагона, IL 6, TNF α , грелина, глюкагон-подобного пептида (GLP-1), ингибитора активатора плазминогена (PAI-1), глюкозо-зависимого пептида (GIP). Данные циркулирующие белки участвуют в метаболизме и усвоении глюкозы. Исследование осуществлялось методом проточной флуориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе - Bio-Plex - 200 Protein Assay System («Bio-Rad», США). Для проведения анализа использовалась новая тест-система «Bio-Plex Pro Human Diabetes 12-Plex Panel» производства «Bio-Rad», кат.№ 171-A4001M. Для обработки данных применялось программное обеспечение Bio-Plex manager Software version 4.1

При статистическом анализе результатов генетических исследований использовали такие показатели как частота встречаемости генов, генотипов и их комбинаций, отношение шансов (OR), информативность по Кульбаку (Jku), диагностический коэффициент (DK), чувствительность (Se) и специфичность (Sp). Частоту аллелей генов цитокинов вычисляли методом прямого подсчета по формуле: $f = n/2N$, где n — количество раз встречаемости аллеля (у гомозигот он учитывался дважды), $2N$ — удвоенная численность обследованных. Частоту встречаемости отдельных генотипов и их комбинаций определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип (комбинацию генотипов), к общему числу обследованных в группе по формуле: $f = n/N$, где n — количество раз встречаемости генотипа (комбинации), N — численность обследованных.

Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга по точному методу Фишера [2].

Статистическую оценку силы ассоциации генов, генотипов и их комбинаций с заболеванием проводили по показателю OR (odds ratio - отношение шансов события в одной

группе к шансам этого же события в другой группе) с расчетом 95% доверительного интервала (95% Confidence Interval – 95%CI) [10, 31].

Достоверность различий частот распределения изучаемых генетических признаков в группах сравнения определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехсторонних таблиц [3].

Если хотя бы одна из частот в таблице сопряженности равнялась 0, то расчет OR, DK и других показателей проводился по модифицированным формулам – ко всем значениям ячеек таблицы 2x2 прибавлялась константа $\delta=0.5$ или 1. В последнем случае, все значения ячеек таблицы сопряженности предварительно удваивались. Данная модификация позволяет избежать ошибочных математических ситуаций, связанных с делением на ноль, или выражений типа $\lg(0)$ [9, 1].

Для описания количественных переменных подсчитывалось среднее значение, доверительный интервал среднего с уровнем вероятности 95%, дисперсия и стандартное отклонение, асимметрия и эксцесс распределений. Определялась медиана, значения верхней и нижней квантили. Учитывая то, что распределение большинства анализируемых количественных переменных оказалось ненормальным, для оценки достоверности различий между группами использовался непараметрический 2-х сторонний U критерий Манна-Уитни. U критерий - наиболее мощная непараметрическая альтернатива t-критерия для независимых выборок. Вычислялась точная вероятность различий, связанная с соответствующей U статистикой. Эта вероятность основана на подсчете всех возможных значений U при заданном количестве наблюдений в двух выборках. Значимыми считались значения $p < 0,05$. Расчет показателей осуществляли с использованием пакета статистических программ Statistica 6.1.

Математическую обработку связи генетических признаков с количественными лабораторными показателями (оптимальная концентрация, ее высокие или низкие значения) проводили в соответствии с методическими и аналитическими подходами квантильного (квантильного) анализа [11, 4]. Деление на квантили — это деление площади под кривой плотности распределения на 4 равные части, что

предполагает одинаковую вероятность попадания случайных величин в каждую из этих равных частей. При этом диапазон оптимума ограничивается значениями квантилей p25 (нижний квантиль) и p75 (верхний квантиль). В качестве параметров повышенной концентрации показателей принимались диапазоны выше p75, а сниженной – ниже p25. О достоверности различий частот встречаемости генетических признаков в альтернативных квантильных диапазонах судили с использованием двустороннего варианта точного метода Фишера.

Для оценки диагностической значимости генетических и генетико-лабораторных признаков вычисляли комплекс стандартных мер информативности (информационная мера Кульбака, диагностический коэффициент), а также показатели их чувствительности и специфичности, расчеты которых осуществляли с использованием общепринятых методов статистического анализа [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходя из поставленной цели исследования на первом этапе необходимо было оценить, является ли группа из более 200 пациентов с сахарным диабетом, состоящая из женщин пожилого возраста, генетически однородной, несмотря на наличие или отсутствие у части из них остеопороза. Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что наличие остеопороза является дискриминирующим фактором, разделяющим группу пациенток с сахарным диабетом по целому ряду генетических признаков.

Нами установлены 25 высоко достоверно (по двустороннему критерию Фишера) различающихся по частоте встречаемости генетических признаков, причем, только 4 из них оказались повышенными среди пациенток с сахарным диабетом без признаков остеопороза, тогда как остальные 21 преобладали среди женщин, страдающих одновременно сахарным диабетом и остеопорозом. Группу этих признаков составили комбинации из 3-х, 4-х, 5-ти и 6-ти генотипов генов цитокинов. В этих комбинациях 53 раза выявлены генотипы TNFA, 22 раза генотипы IL-6, 14 раз генотипы IL-1B, 13 раз генотипы VEGF и 9 раз генотипы IL-10. Обращает на себя внимание, что из 53 генотипов TNFA, 42 представляют

Таблица 1.
Частоты встречаемости высокоинформативных комбинаций аллелей генов цитокинов по различному числу локусов среди женщин пожилого возраста, страдающих сахарным диабетом 2 типа с развившемся (ОП+) и не развившемся (ОП-) остеопорозом (в %)

Комбинации полиморфизмов генов цитокинов	Генотипы	ОП (+)	ОП (-)	OR (CI 95%)	DK	Специфичность	Чувствительность
TNF-863:TNF-238:IL10-592	CC-GA-CC	0,00	7,03	0,08 (0.00 - 1.33)	-10,9	100,00	7,03
TNF-308:IL1B-31:IL6-174	GA-TT-GG	6,10	0,77	8,38 (0.96 - 73.04)	9,0	99,23	6,10
TNF-308:IL6-174:IL10-592	GA-GG-CA	4,88	0,00	14,73 (0.78 - 277.36)	11,5	100,00	4,88
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL10-592	CC-GG-GA-CC	0,00	7,03	0,08 (0.00 - 1.33)	-10,9	100,00	7,03
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174	CC-GA-TT-GG	6,10	0,77	8,38 (0.96 - 73.04)	9,0	99,23	6,10
TNF-863:TNF-308:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-CC-CA	12,35	3,13	4,37 (1.32 - 14.43)	6,0	96,88	12,35
TNF-863:TNF-238:IL1B-31:IL6-174	CC-GG-TC-CC	8,54	2,31	3,95 (0.99 - 15.74)	5,7	97,69	8,54
TNF-863:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-TC-CC-CA	6,17	0,78	8,36 (0.96 - 72.87)	9,0	99,22	6,17
TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174	GA-GG-TT-GG	6,10	0,77	8,38 (0.96 - 73.04)	9,0	99,23	6,10
TNF-308:TNF-238:IL6-174:IL10-592	GA-GG-GG-CA	4,88	0,00	14,73 (0.78 - 277.36)	11,5	100,00	4,88
TNF-308:TNF-238:IL6-174:VEGF2578	GG-GG-CC-CA	17,28	7,03	2,76 (1.14 - 6.72)	3,9	92,97	17,28
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174	CC-GG-GG-TC-CC	8,54	2,31	3,95 (0.99 - 15.74)	5,7	97,69	8,54
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174	CC-GA-GG-TT-GG	6,10	0,77	8,38 (0.96 - 73.04)	9,0	99,23	6,10
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-GG-CC-CA	12,35	3,13	4,37 (1.32 - 14.43)	6,0	96,88	12,35
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-TT-GG-CC	0,00	7,03	0,08 (0.00 - 1.33)	-10,9	100,00	7,03
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-TT-CC-CA	6,17	0,78	8,36 (0.96 - 72.87)	9,0	99,22	6,17
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-TC-CC-CA	6,17	0,78	8,36 (0.96 - 72.87)	9,0	99,22	6,17
TNF-863:TNF-308:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GG-CC-CA-CA	4,94	0,00	14,81 (0.79 - 278.79)	11,5	100,00	4,94
TNF-863:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-TC-CC-CA	6,17	0,78	8,36 (0.96 - 72.87)	9,0	99,22	6,17
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592	CC-GG-GG-TT-GG-CC	0,00	6,25	0,09 (0.00 - 1.51)	-10,4	100,00	6,25
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-GG-TT-CC-CA	6,17	0,78	8,36 (0.96 - 72.87)	9,0	99,22	6,17
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-GG-TC-CC-CA	6,17	0,78	8,36 (0.96 - 72.87)	9,0	99,22	6,17
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GG-GG-CC-CA-CA	4,94	0,00	14,81 (0.79 - 278.79)	11,5	100,00	4,94

Здесь и далее: OR – отношение шансов; DK – диагностический коэффициент

собой гомозиготные варианты, аллели которых ассоциируются с низким уровнем продукции самого фактора некроза опухолей альфа [15].

Эти данные свидетельствуют о том, что взаимоотношения между генотипом промоторных участков генов цитокинов и их уровнем в сыворотке крови человека не носят прямой зависимости, а подвергаются воздействию дополнительных регуляторных сигналов.

Об этом говорят и результаты исследований [14, 42], в которых было установлено повышение уровня провоспалительных цитокинов при сахарном диабете 2 типа.

В группах больных сахарным диабетом 2 типа были проанализированы параметры, характеризующие инсулинорезистентность, эндотелиальную дисфункцию и воспаление. В результате чего были выявлены определенные отличия у больных с сахарным диабетом имеющих остеопороз в сравнении с пациентами без остеопороза. Данные представлены в таблице 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что среди тех пациентов, у которых течение сахарного диабета сопровождалось развитием остеопороза, достоверно повышено содержание С-пептида и GLP-1. Имеются данные об ассоциации между повышенным уровнем С-пептида, GLP-1 и увеличением концентрации маркеров костной резорбции остеокальцина и остеопротегерина соответственно [38]. У больных с остеопорозом были снижены концентрации GIP, лептина, PAI-1 и висфатина. Учитывая способность лептина стимулировать функции остеобластов, снижение его содержания может играть роль в развитии остеопороза. Сниженный уровень PAI-1 и висфатина, индуцирующих экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , IL-1 и IL-6, может свидетельствовать о более низком уровне повреждения эндотелия, хотя концентрация самих цитокинов достоверно не различалась, как и содержание грелина, инсулина, резистина и глюкагона.

Учитывая представленные в начале этой статьи данные об ассоциированности течения остеопороза у больных сахарным диабетом с генотипами цитокинов, мы провели анализ ассоциированности с этими генетическими маркерами и уровня показателей углеводного обмена у больных сахарным диабетом.

Как видно из данных таблицы 3, из 12 исследованных показателей значения лишь 7 из них ассоциированы с генотипами цитокинов. Если ассоциированность уровней IL-6 и TNF- α с их генотипами описана в литературе [42], то ассоциированность уровней инсулина, резистина, лептина, глюкагона и PAI-1 с генотипами цитокинов при сахарном диа-

Таблица 2.
Концентрации показателей характеризующих инсулинорезистентность, эндотелиальную дисфункцию и воспаление у пациентов с сахарным диабетом 2 типа с наличием или отсутствием остеопороза, (пкг/мл)

Показатель	Пациенты с ОП	Пациенты без ОП	p
С-пептид	1120,720	947,451	0,025*
GIP	24,071	50,856	0,009*
Грелин	419,720	438,526	0,156
Глюкагон	1116,956	1135,751	0,973
GLP-1	336,970	196,220	0,000*
IL-6	13,715	16,406	0,844
Инсулин	1123,359	1762,102	0,719
Лептин	3804,635	8290,757	0,037*
PAI-1	6095,287	9368,771	0,002*
Резестин	1439,593	6317,387	0,152
TNF- α	15,220	14,988	0,298
Висфатин	1015,230	2434,059	0,043*

Примечание: * - отмечены значения с уровнем достоверности различий $p < 0,05$ (по критерию Манн-Уитни)

бете 2 типа, описана в этом сообщении нами впервые. Наибольшее число выявленных достоверных ассоциативных связей генотипов цитокинов установлено нами для значений лептина, причем с генотипами цитокинов ассоциируются в 75% лишь низкие значения его концентраций в крови.

Среди ассоциированных с низким уровнем инсулина генотипов цитокинов обращает на себя внимание преобладание гомозиготного генотипа TT гена IL-1B в позиции T-31C, который в свою очередь ассоциируется с высоким уровнем продукции провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β [45]. Регулярно отмечается и присутствие в комбинированных генетических признаках и гомозиготных вариантов генотипов CC и GG гена TNFA в позициях A-863C и A-238G, ассоциированных с низким уровнем продукции фактора некроза опухолей альфа [21].

Среди генотипов, ассоциированных с низким уровнем лептина, обращает на себя внимание частое присутствие гомозиготного варианта GG гена IL-6 в позиции G -174C, ассоциированного с высоким уровнем продукции этого интерлейкина-6 с высокой провоспалительной активностью, а также с развитием самого сахарного диабета 2 типа и уровнем глюкозы у этих больных [26, 28].

В завершении нами проведено исследование характера ассоциированности генотипов цитокинов с остеопорозом, вне связи с сахарным диабетом. С этой целью нами проведено сопоставление этих генетических признаков в группе женщин с постменопаузальным остеопорозом с группой здоровых женщин аналогичного пожилого возраста без признаков сахарного диабета и остеопороза.

Результаты проведенного исследования, представленные в таблице 4, показали наличие целого ряда высоко достоверных различий между этими группами женщин. Выяснилось, что различные генотипы практически всех исследованных полиморфизмов генов цитокинов входят в состав комплексных генетических параметров, частота которых среди женщин с постменопаузальным остеопорозом отличается от нормального распределения. Вместе с тем в большинстве случаев, олигонуклеотидные замены в точках полиморфизма промоторных зон генов цитокинов, входящие в состав этих генетических комбинированных признаков, отличаются от генетических параметров, ассоциированных с развитием остеопороза при сахарном диабете.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для большинства проанализированных полиморфизмов генов цитокинов в популяциях различного происхождения установлена связь с развитием остеопении и остеопороза.

Большинство данных посвящено анализу степени ассоциированности остеопороза с аллельными вариантами промоторного участка гена IL-6 стимулирующего остеокластогенез и вызывающего резорбцию кости. Генотип CC гена IL-6 позиции G -174C связан с низким уровнем продукции этого цитокина и соответственно с более низкой резорбцией костной ткани и с более высокой плотностью кости у женщин в постменопаузальном периоде, по сравнению с генотипами GG и GC. Следовательно, аллель С может рассматриваться в качестве протективной, а аллель G в качестве предрасполагающей к развитию остеопороза у пожилых женщин [43]. Данные по генотипированию других европеоидных популяций подтверждают эти положения. Так в молодом возрасте французские женщины с генотипом CC гена IL-6 в позиции G -174C имеют более высокую плотность кости, тогда как в постменопаузальном периоде они характеризовались более выраженной потерей костной массы [36].

Сходные результаты получены и при исследовании более 3000 белых американских женщин, которые показали, что женщины с CC генотипом в позиции G -174C гена IL-6 имели значительно более медленное развитие резорбции

Таблица 3.

Параметры ассоциированности генотипов цитокинов с высокими и низкими значениями показателей характеризующих инсулинорезистентность, эндотелиальную дисфункцию и воспаление у больных сахарным диабетом 2 типа

Показатель	Полиморфизм	Генотип	Высокие (в %)	Низкие (в %)	OR	CI 95%	Чувствительность	Специфичность	DK
Инсулин	IL1B-31	TT	35,29	90,91	0,05	0,01 - 0,54	90,91	64,71	-4,1
Резистин	TNF-308	GA	40,00	5,26	12,00	1,33 - 108,68	40,00	94,74	8,8
IL-6	IL6-174:IL10-592	GG-CA	0,00	30,00	0,06	0,00 - 1,10	30,00	100,00	-10,9
IL-6	IL6-174:VEGF2578	GG-CA	0,00	35,00	0,05	0,00 - 0,88	35,00	100,00	-11,5
Инсулин	TNF-863:IL1B-31	CC-TT	23,53	72,73	0,12	0,02 - 0,66	72,73	76,47	-4,9
Инсулин	TNF-308:IL1B-31	GG-TT	29,41	90,91	0,04	0,00 - 0,42	90,91	70,59	-4,9
Инсулин	TNF-238:IL1B-31	GG-TT	35,29	90,91	0,05	0,01 - 0,54	90,91	64,71	-4,1
Инсулин	IL1B-31:IL10-592	TT-CA	0,00	45,45	0,03	0,00 - 0,70	45,45	100,00	-12,2
Лептин	TNF-863:IL10-592	CC-CA	10,53	52,63	0,11	0,02 - 0,59	52,63	89,47	-7,0
Лептин	TNF-238:IL6-174	GG-GG	10,53	47,37	0,13	0,02 - 0,73	47,37	89,47	-6,5
Лептин	IL6-174:IL10-592	GG-CA	0,00	31,58	0,05	0,00 - 1,03	31,58	100,00	-11,1
Лептин	IL6-174:VEGF2578	GG-CA	0,00	36,84	0,04	0,00 - 0,82	36,84	100,00	-11,8
Лептин	IL6-174:VEGF2578	GC-CA	52,63	10,53	9,44	1,69 - 52,73	52,63	89,47	7,0
PAI-1	TNF-238:IL6-174	GG-GC	70,59	23,53	7,80	1,69 - 36,06	70,59	76,47	4,8
Резистин	IL6-174:VEGF2578	GC-CA	47,37	10,53	7,65	1,37 - 42,71	47,37	89,47	6,5
TNF-a	TNF-863:VEGF2578	CC-CA	25,00	64,71	0,18	0,04 - 0,75	64,71	75,00	-4,1
Глюкагон	TNF-863:IL10-592:VEGF2578	CC-CC-CA	0,00	31,58	0,05	0,00 - 1,03	31,58	100,00	-11,1
IL-6	TNF-863:IL6-174:IL10-592	CC-GG-CA	0,00	30,00	0,06	0,00 - 1,10	30,00	100,00	-10,9
IL-6	TNF-863:IL6-174:VEGF2578	CC-GG-CA	0,00	35,00	0,05	0,00 - 0,88	35,00	100,00	-11,5
IL-6	TNF-238:IL1B-31:IL6-174	GG-TT-GG	0,00	30,00	0,06	0,00 - 1,10	30,00	100,00	-10,9
Лептин	IL6-174:VEGF2578	GC-CA	52,63	10,53	9,44	1,69 - 52,73	52,63	89,47	7,0
PAI-1	TNF-238:IL6-174	GG-GC	70,59	23,53	7,80	1,69 - 36,06	70,59	76,47	4,8
IL-6	TNF-238:IL6-174:IL10-592	GG-GG-CA	0,00	30,00	0,06	0,00 - 1,10	30,00	100,00	-10,9
IL-6	TNF-238:IL6-174:VEGF2578	GG-GG-CA	0,00	35,00	0,05	0,00 - 0,88	35,00	100,00	-11,5
Инсулин	TNF-863:TNF-308:IL1B-31	CC-GG-TT	23,53	72,73	0,12	0,02 - 0,66	72,73	76,47	-4,9
Инсулин	TNF-863:TNF-238:IL1B-31	CC-GG-TT	23,53	72,73	0,12	0,02 - 0,66	72,73	76,47	-4,9
Инсулин	TNF-863:IL1B-31:IL10-592	CC-TT-CA	0,00	45,45	0,03	0,00 - 0,70	45,45	100,00	-12,2
Инсулин	TNF-308:TNF-238:IL1B-31	GG-GG-TT	29,41	90,91	0,04	0,00 - 0,42	90,91	70,59	-4,9
Инсулин	TNF-308:IL1B-31:IL10-592	GG-TT-CA	0,00	45,45	0,03	0,00 - 0,70	45,45	100,00	-12,2
Инсулин	TNF-238:IL1B-31:IL10-592	GG-TT-CA	0,00	45,45	0,03	0,00 - 0,70	45,45	100,00	-12,2
IL-6	TNF-238:IL6-174:IL10-592	GG-GG-CA	0,00	30,00	0,06	0,00 - 1,10	30,00	100,00	-10,9
Лептин	TNF-863:TNF-308:IL10-592	CC-GG-CA	5,26	42,11	0,08	0,01 - 0,70	42,11	94,74	-9,0
Лептин	TNF-863:TNF-238:IL10-592	CC-GG-CA	10,53	47,37	0,13	0,02 - 0,73	47,37	89,47	-6,5
Лептин	TNF-863:IL6-174:IL10-592	CC-GG-CA	0,00	31,58	0,05	0,00 - 1,03	31,58	100,00	-11,1
Лептин	TNF-308:IL6-174:VEGF2578	GG-GG-CA	0,00	31,58	0,05	0,00 - 1,03	31,58	100,00	-11,1
Лептин	TNF-238:IL1B-31:IL6-174	GG-TT-GG	0,00	31,58	0,05	0,00 - 1,03	31,58	100,00	-11,1
Лептин	TNF-238:IL6-174:VEGF2578	GG-GG-CA	0,00	36,84	0,04	0,00 - 0,82	36,84	100,00	-11,8
Лептин	TNF-238:IL6-174:VEGF2578	GG-GC-CA	47,37	10,53	7,65	1,37 - 42,71	47,37	89,47	6,5
PAI-1	TNF-863:TNF-238:IL6-174	CC-GG-GC	70,59	23,53	7,80	1,69 - 36,06	70,59	76,47	4,8
TNF-a	TNF-863:TNF-238:VEGF2578	CC-GG-CA	25,00	64,71	0,18	0,04 - 0,75	64,71	75,00	-4,1
TNF-a	TNF-863:IL10-592:VEGF2578	CC-CC-CA	10,00	47,06	0,13	0,02 - 0,71	47,06	90,00	-6,7

Примечания: приведены значения с уровнем достоверности различий $p < 0,03$; в столбцах «высокие» и «низкие» приведена частота в % встречаемости генотипа среди пациентов, значения признака у которых соответствуют значениям максимальных или минимальных квантилей.

кости и на 33 % более низкий риск перелома запястья, чем женщины с генотипом GG [25].

Данные по монголоидным популяциям более противоречивы. Так среди корейских женщин установлена связь аллельного варианта G гена IL-6 в позиции G -597A с низкими показателями минеральной плотности кости, которая наиболее выражена для гомозиготного варианта GG [34]. Однако, среди пожилых японских женщин из 47 человек с переломами шейки бедра, 96 % имели S аллель в положении G-573C IL-6 гена. В генотипе CC, установлены отрицательные отношения между минеральной плотностью шейки бедра и уровнями IL-6, тогда как среди пациентов с генотипами GC+CC плотность шейки бедра имели тенденцию быть связанными с уровнями IL-6 [19].

Исследование об ассоциированности аллелей гена IL-6 в точке полиморфизма G -174C с предрасположенностью к развитию вторичного остеопороза при сахарном диабете должны быть подвергнуты весьма осторожной трактовке ввиду того, что для аллелей этого гена в той же точке уста-

новлена ассоциированность с развитием самого сахарного диабета 2 типа, особенно выраженная среди женщин европеоидного происхождения.

Так достоверно установлено наличие ассоциации между IL-6 -174C аллелем и сахарным диабетом при генотипировании 416 представителей 253 датских семей [20].

В известном американском исследовании остеопоротических переломов, охватывающим обследование более 4000 женщин, результаты которого были опубликованы в 2005 г., была установлена ассоциация между высокой костной массой у женщин – носителей генотипа AA в позиции G -308A промоторного участка гена TNFA в сравнении с носителями генотипа GG [29].

Среди европеоидных шведских женщин показано, что носители редких аллелей TNFA в полиморфных позициях промоторного участка A-863C обладали более высокой массой тела и минеральной плотностью кости [35].

Меньше исследований посвящено исследованию связи предрасположенности к остеопорозу с аллельными вариантами других генов цитокинов.

Таблица 4.

Параметры ассоциированности генотипов цитокинов с постменопаузальным остеопорозом, (в %)

Полиморфизм	Генотип	Остеопороз в %	Контроль в %	OR	CI 95%	Чувствительность	Специфичность	DK
IL6 G-174C	G	68,42	52,29	1,98	1.19 - 3.28	68,42	47,71	1,2
IL6 G-174C	C	31,58	47,71	0,51	0.31 - 0.84	47,71	68,42	-1,8
IL6 G-174C	CC	5,26	23,21	0,18	0.04 - 0.78	23,21	94,74	-6,4
TNF-308:IL6-174	GA-GG	15,79	4,87	3,66	1.35 - 9.94	15,79	95,13	5,1
IL6-174:IL10-592	GG-AA	5,26	0,00	45,55	2.15 - 967.15	5,26	100,00	16,4
TNF-863:TNF-308:IL6-174	CC-GA-GG	13,16	3,44	4,26	1.41 - 12.82	13,16	96,56	5,8
TNF-863:IL1B-31:IL6-174	CA-TT-GC	15,79	4,68	3,82	1.37 - 10.63	15,79	95,32	5,3
TNF-863:IL1B-31:IL10-592	CC-TC-AA	5,26	0,00	40,07	1.89 - 851.02	5,26	100,00	15,8
TNF-863:IL1B-31:VEGF2578	AA-TC-CA	5,41	0,00	42,18	1.99 - 896.33	5,41	100,00	16,0
TNF-863:IL6-174:IL10-592	CC-GG-AA	5,26	0,00	45,55	2.15 - 967.15	5,26	100,0	16,4
IL1B-31:IL6-174:IL10-592	TC-GG-AA	5,26	0,00	39,11	1.84 - 830.70	5,26	100,0	15,7
IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	TT-GG-CA	18,92	4,45	5,01	1.86 - 13.52	18,92	95,55	6,3
IL6-174:IL10-592:VEGF2578	GG-CA-CA	13,51	3,48	4,33	1.39 - 13.45	13,51	96,52	5,9
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174	CC-GA-TT-GG	7,89	0,67	12,73	2.06 - 78.81	7,89	99,33	10,7
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174	CA-GG-TT-GC	15,79	4,01	4,48	1.58 - 12.76	15,79	95,99	5,9
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL10-592	CC-GG-TC-CC	2,63	17,81	0,12	0.02 - 0.93	17,81	97,37	-8,3
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:VEGF2578	AA-GG-TC-CA	5,41	0,00	42,18	1.99 - 896.33	5,41	100,0	16,0
TNF-863:TNF-308:IL6-174:VEGF2578	CC-GA-GG-CA	8,11	1,01	8,65	1.68 - 44.54	8,11	98,99	9,0
TNF-863:TNF-238:IL1B-31:IL6-174	CA-GG-TT-GC	15,79	4,23	4,25	1.49 - 12.10	15,79	95,77	5,7
TNF-863:TNF-238:IL1B-31:VEGF2578	AA-GG-TC-CA	5,41	0,00	40,49	1.91 - 860.49	5,41	100,0	15,8
TNF-863:IL1B-31:IL6-174:IL10-592	CC-TC-GG-AA	5,26	0,00	39,11	1.84 - 830.70	5,26	100,0	15,7
TNF-863:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-TT-GG-CA	16,22	3,42	5,46	1.86 - 16.04	16,22	96,58	6,8
TNF-863:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GG-CA-CA	13,51	1,74	8,81	2.42 - 32.09	13,51	98,26	8,9
TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592	GA-TT-GG-CA	7,89	0,70	12,13	1.96 - 75.11	7,89	99,30	10,5
TNF-308:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	GA-TT-GG-CA	8,11	0,00	59,35	3.00 - 1173.3	8,11	100,0	17,4
TNF-308:IL1B-31:IL10-592:VEGF2578	GA-TT-CA-CA	10,81	0,69	17,39	3.07 - 98.63	10,81	99,31	11,9
IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	TT-GG-CA-CA	8,11	0,71	12,35	1.99 - 76.57	8,11	99,29	10,6
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174	CA-GG-GG-TT-GC	15,79	3,52	5,14	1.75 - 15.07	15,79	96,48	6,5
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:VEGF2578	AA-GG-GG-TC-CA	5,41	0,00	40,49	1.91 - 860.49	5,41	100,0	15,8
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592	CC-GA-TT-GG-CA	7,89	0,70	12,13	1.96 - 75.11	7,89	99,30	10,5
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GA-TT-GG-CA	8,11	0,00	59,35	3.00 - 1173.3	8,11	100,0	17,4
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL10-592:VEGF2578	CC-GA-TT-CA-CA	10,81	0,69	17,39	3.07 - 98.63	10,81	99,31	11,9
TNF-863:TNF-238:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GG-GG-CA-CA	10,81	1,82	6,55	1.67 - 25.59	10,81	98,18	7,7
TNF-863:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-TT-GG-CA-CA	8,11	0,71	12,35	1.99 - 76.57	8,11	99,29	10,6
TNF-863:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CA-TT-GC-CA-CC	8,11	0,71	12,35	1.99 - 76.57	8,11	99,29	10,6
TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	GA-GG-TT-GG-CA	5,41	0,00	39,51	1.86 - 839.58	5,41	100,0	15,7
TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL10-592:VEGF2578	GA-GG-TT-CA-CA	8,11	0,72	12,13	1.96 - 75.21	8,11	99,28	10,5
TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	GG-TT-GC-CA-CC	8,11	0,71	12,35	1.99 - 76.57	8,11	99,29	10,6
TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	GA-TT-GG-CA-CA	8,11	0,00	57,32	2.90 - 1133.2	8,11	100,0	17,2
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592	CA-GG-GG-TT-GC-CA	7,89	0,73	11,61	1.88 - 71.94	7,89	99,27	10,3
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CC-GA-GG-TT-GG-CA	5,41	0,00	39,51	1.86 - 839.58	5,41	100,0	15,7
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:VEGF2578	CA-GG-GG-TT-GC-CC	8,11	0,71	12,26	1.98 - 76.02	8,11	99,29	10,6
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL10-592:VEGF2578	CC-GA-GG-TT-CA-CA	8,11	0,72	12,13	1.96 - 75.21	8,11	99,28	10,5
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL10-592:VEGF2578	CA-GG-GG-TT-CA-CC	8,11	0,72	12,13	1.96 - 75.21	8,11	99,28	10,5
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CA-GG-GG-GC-CA-CC	8,11	0,73	12,04	1.94 - 74.66	8,11	99,27	10,5
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GG-TC-GG-CA-CA	5,41	0,00	39,79	1.87 - 845.56	5,41	100,0	15,8
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GA-TT-GG-CA-CA	8,11	0,00	57,32	2.90 - 1133.2	8,11	100,0	17,2
TNF-863:TNF-308:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CA-GG-TT-GC-CA-CC	8,11	0,35	24,79	2.51 - 245.09	8,11	99,65	13,6
TNF-863:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CA-GG-TT-GC-CA-CC	8,11	0,37	23,74	2.40 - 234.66	8,11	99,63	13,4
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592	CA-GG-GG-TT-GC-CA	7,89	0,73	11,61	1.88 - 71.94	7,89	99,27	10,3
TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	GG-GG-TT-GC-CA-CC	8,11	0,37	23,74	2.40 - 234.66	8,11	99,63	13,4
TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	GA-GG-TT-GG-CA-CA	5,41	0,00	38,10	1.79 - 809.72	5,41	100,0	15,6
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GG-GG-TC-GG-CA-CA	5,41	0,00	38,10	1.79 - 809.72	5,41	100,0	15,6
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CC-GA-GG-TT-GG-CA-CA	5,41	0,00	38,10	1.79 - 809.72	5,41	100,0	15,6
TNF-863:TNF-308:TNF-238:IL1B-31:IL6-174:IL10-592:VEGF2578	CA-GG-GG-TT-GC-CA-CC	8,11	0,00	54,88	2.78 - 1085.2	8,11	100,0	17,0

Примечания: приведены значения с уровнем достоверности различий $p < 0,02$

При исследовании 400 женщин славянской этнической группы в Словении, была установлена ассоциированность гаплотипа аллельных вариантов трех полиморфных позиций С -29/Т, С -643Т и - G 693С промоторного участка гена TNFSF11 с минеральной плотностью кости [41].

Эти, и другие многочисленные данные указывают на несомненную связь между генетической предрасположенностью к развитию остеопороза и сахарного диабета 2 типа. Однако прослеживается определенная зависимость полученных результатов с этнической принадлежностью обследованных лиц. Это делает проведение подобных исследований в России особенно актуальным, т.к. хорошо известен полиэтничный характер ее населения, требующий создания национальных стандартов характера распределения аллельного полиморфизма генов [32].

Другим важным следствием анализа имеющихся по данному вопросу данных, является заключение о популяционном характере выявленных связей между аллельными вариантами отдельных полиморфизмов, что делает их мало пригодными в клинической практике. Это ставит вопрос как о поиске новых, более информативных полиморфных участках, или о комплексном исследовании большего числа одновременно выявляемых полиморфизмов у одного пациента.

Наше исследование предлагает результаты подхода именно в этом направлении, когда анализируется одновременно комбинации вариантов структуры 7 полиморфных точек генов цитокинов. В результате проведенного исследования можно сделать определенные заключения.

Во-первых, нами установлено, что остеопороз у пациентов с сахарным диабетом 2 типа преимущественно развивается у лиц с определенными комбинациями аллельных вариантов генов цитокинов. В этих комбинациях принимают участие аллельные варианты полиморфных точек промоторных участков генов цитокинов с провоспалительной и противовоспалительной активностью. Однонуклеотидные замены в этих полиморфных участках способны влиять на уровень продукции соответствующих цитокинов, и таким образом реализовывать связь между генотипом человека и степенью активности течения воспалительных процессов у данного индивида в случае заболевания.

Другим следствием проведенного исследования является выявление особенностей углеводного обмена и инсулинорезистентности у тех пациентов с сахарным диабетом, у которых развивается или не развивается остеопороз. Полученные данные свидетельствуют о том, что среди тех пациентов, у которых течение сахарного диабета сопровождалось развитием остеопороза, достоверно повышено содержание С-пептида и глюкагон-подобного пептида GLP-1. Снижено содержание в крови стимулятора GIP, лептина, ингибитора активации плазминогена PAI-1 и висфатина, индуцирующего экспрессию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 и IL-6.

И в заключительной части исследования получены данные, позволяющие приблизиться к пониманию связи между вариантами течения сахарного диабета 2 типа с наличием или отсутствием остеопороза с комбинациями аллельных вариантов генов цитокинов. Как выяснилось, аллельные варианты полиморфных участков промоторных зон генов цитокинов оказывают влияние не только на уровень продукции лимфоцитами, макрофагами, дендритными и другими клетками цитокинов с провоспалительной или с противовоспалительной активностью, но и связаны с уровнем продукции факторов, регулирующих углеводный обмен при сахарном диабете 2 типа.

Получены также данные о генетических различиях по выявленным комплексным генетическим признакам между здоровыми пожилыми женщинами и больными с постменопаузальным остеопорозом, в значительной части отличающиеся от генетических параметров, характерных для

пациенток с остеопорозом, развившимся на фоне текущего сахарного диабета. Эти комплексные признаки основаны на анализе полиморфизмов генов IL-1B, IL-6, IL-10, TNFA и VEGF.

Об этом же свидетельствуют результаты итогов многоцентровых исследования, охвативших результаты 21 проекта с участием более 20 000 пациентов, и показавших, что определенные аллели генов цитокинов (в частности и проанализированный нами полиморфизм гена IL-6 в точке полиморфизма промотора G -174C, оказывают значимое влияние на предрасположенность человека к развитию как сахарного диабета 2 типа, так и остеопороза [6].

Разработанные нами новые подходы к анализу генетических факторов риска развития остеопороза у больных сахарным диабетом 2 типа основаны на использовании комплекса генотипов промоторных участков цитокинов и могут иметь дополнительное значение в клинике в качестве прогностических биологических маркеров предрасположенности больного к развитию остеопороза, ввиду их высокой чувствительности и специфичности. Эти подходы должны развиваться в качестве основ персонализированной медицины, основанной на анализе параметров генома пациента. Ввиду неизменности генетических признаков в течении жизни пациента, такие прогностические критерии могут быть установлены на самых ранних этапах развития болезни и позволяют провести обоснованное планирование стратегии лечения пациента с привлечением способов терапии, профилактирующих неблагоприятные варианты развития болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятия, вычисление и интерпретация // Украинский медицинский журнал. – 2005. - №2 (46). – С. 113-119.
2. Вейр Б. Анализ генетических данных: Дискретные генетические признаки: Пер. с англ. – М.: Мир, 1995. – 400 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 С.
4. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1983. – 296 С.
5. Картамышева Н. Н., Чумакова О. В. Костное ремоделирование как модель межклеточных взаимодействий // *Нефрология и диализ*. - 2004. - Т. 6. №1. – С. 3-13.
6. Коненков В.И. Медицинская и экологическая иммуногенетика. – СО РАМН.: Новосибирск. - 1999. - 250 С.
7. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В. и соав. Комплексный анализ полиморфизма в промоторных участках генов цитокинов IL-1B T-31C, IL-6 G-174C, TNFA G-238A, TNFA G-308A, TNFA C-863A, IL-4 C-590T и IL-10 C-592A в прогнозе эффекта от лечения ревматоидного артрита // *Мед. иммунология*. – 2010. – №4-5. – С. 361-374.
8. Ластед Л.Б. Введение в проблему принятия решений в медицине. – М.: Мир, 1971. - 282 С.
9. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // *Вестник АМН СССР*. - 1998. - №7. - С. 48-51.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: Медиасфера. – 2002. – 312 С.
11. Шорников Б.С. Классификация и диагностика в биологическом эксперименте. Проблема оценки и классификации интерьерных признаков человека – М.: Наука. – 1979. – 142 С.
12. Asghar T, Yoshida, Kennedy . The tumor necrosis factor- α promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population // *Human Reproduction*.- 2004.- Vol.19 (11).-P. 2509–2514.

13. Banyasz I., Szabo Szilvia, Géza Bokodi, Ádám Vannay, Barna Vászárhelyi, András Szabó, Tivadar Tulassay and János Rigó Jr. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia // *Molecular Human Reproduction*. – 2006. – Vol.12, No.4. – P. 233–236.
14. Botushanov NP, Orbetzova MM. Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus // *Folia Med (Plovdiv)*. – 2009. – Vol.51(4). – P. 12-7.
15. Bouma G., Crusius J.B.A., Oudkerk P.M., Kolkman J.J. et al.. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease // *Scand. J. Immunol.* – 1996. – Vol.43. – P. 456-463.
16. Bown M.J., Weston S., Horsburgh T., Nicholson M.L. et al. A comparison of methods for determining genotypes at the tumour necrosis factor-alpha-308, interleukin (IL)-1beta -3953, IL-6 -174 and IL-10 -1082/-819/-592 polymorphic loci // *Int. J. Immunogenet.* – 2005. – v.32(2).- P. 83-90.
17. Cantagrel A., Navaux F., Loubet-Lessonlie P. IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-4, and IL-10 gene polymorphisms // *Arthr Rheum.* - 1999.-Vol.42(6). – P. 1093-1100.
18. Choi E., Lee H. J., Yoo T., Chanock S.A. Common haplotype of interleukin-4 gene IL4 is associated with severe respiratory syncytial virus disease in Korean children // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2002. - Vol.186. - P.1207–1211.
19. Chung H.W., Seo J.S., Hur S.E., Kim H.L. et al. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women // *J. Hum. Genet.* – 2003. - v.48(5). – P. 243-248.
20. Feng D., Ishibashi H., Yamamoto S., Hosoi T. et al. Association between bone loss and promoter polymorphism in the IL-6 gene in elderly Japanese women with hip fracture // *J. Bone. Miner. Metab.* – 2003. – V. 21(4). – P. 225-228.
21. Fernandez-Real J.-M., Vendrell J., Richart C., et al. Platelet count and Interleukin 6 Gene polymorphism in healthy subjects // *BMC Medical Genetics*. - 2001. - Vol. 2(6). – P. 356-367.
22. Ferrari S.L., Garnero P., Emond S., Montgomery H. et al. A functional polymorphic variant in the interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women // *Arthritis Rheum.* – 2001. – Vol.44 (1). - P. 196-201.
23. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) // *Circulation*. – 2000. - Vol 4;102(1). - P. 42-47.
24. Furuta I., Kobayashi N., Fujino T., Kobamatsu Y. et al. Bone mineral density of the lumbar spine is associated with TNF gene polymorphisms in early postmenopausal Japanese women // *Calcif. Tissue. Int.* - 2004. – V.74(6). - P. 509-515.
25. Garnero P., Borel O., Sornay-Rendu E., Duboeuf F. et al. Association between a functional interleukin-6 gene polymorphism and peak bone mineral density and postmenopausal bone loss in women: the OFELY study // *Bone*. – 2002. – V. 31(1). – P. 43-50.
26. Herbert A., Liu C., Karamohamed S., Schiller J. et al. The -174 IL-6 GG genotype is associated with a reduced risk of type 2 diabetes mellitus in a family sample from the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study // *Diabetologia*. – 2005. – V.48(8). – P. 1492-1495.
27. Hofbauer L.C., Schoppert M. Osteoprotegerin Gene Polymorphism and the Risk of Osteoporosis and Vascular Disease // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. - 2002. - V.87 (9). – P. 4078–4079.
28. Huth C., Heid I.M., Vollmert C., Gieger C. Et al. IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies // *Diabetes*. – 2006. – V.55 (10). – P. 2915-2921.
29. Kristiansen O.P., Nolsøe R.L., Larsen L., Gjesing A.M. et al. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – V. 12(10). – P. 1101-1110.
30. Li HQ, Li Z, Liu Y, Li JH, Dong JQ, Gao JR, Gou CY, Li H. Association of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection // *World J Gastroenterol*. - 2005. - Vol.11(33). - P. 5213-5217.
31. Mehta C.R. On computing an exact confidence interval for the common odds ratio in several 2 x 2 contingency tables / C.R. Mehta, N.R. Patel and R. Gray // *JASA*. – 1985. – Vol. 80. – P. 969 – 973.
32. Mencej S., Albagha O.M., Prezelj J., Kocjan T., Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis // *J. Mol. Endocrinol.* – 2008. – V. 40(6). – P. 273-279.
33. Mock C.C., Lanchbury J.S., Chan D.W., Lau C.S. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus // *Arthritis Rheum*. - 1998. - Vol. 41. – P. 1090 - 1095.
34. Moffett S.P., Zmuda J.M., Cauley J.A., Stone K.L. et al. Association of the G-174C variant in the interleukin-6 promoter region with bone loss and fracture risk in older women // *J. Bone Miner. Res.* – 2004. – V.19(10). – P. 1612-1618.
35. Moffett S.P., Zmuda J.M., Oakley J.I., Beck T.J. et al. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism, bone strength phenotypes, and the risk of fracture in older women // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – V.90(6). – P. 3491-3497.
36. Olivier F, Bonafè M, Cavallone L, Giovagnetti S, et al. The -174 C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging // *Exp. Gerontol.* – 2002. – V. 37(2-3). – P. 309-314.
37. Patino-Garcia A., Sotillo-Pineiro E., Modesto C., Sierrasesumaga L. Screening of the Tumor Necrosis Factor- Alpha gene Promoter Polymorphisms by PCR-DGGE analysis // *Mutation Research Genomics*. - 1999. – Vol. 406. – P. 121-125.
38. Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes // *Life Sci*. – 2000. – Vol.8;67(3). – P. 291-300.
39. Tasker P.N., Albagha O.M., Masson C.B., Reid DM, Ralston SH. Association between TNFRSF1B polymorphisms and bone mineral density, bone loss and fracture // *Osteoporos. Int.* – 2004. – Vol.15 (11). – P. 903-908.
40. Utriainen T, Takala T, Luotolahti M, Rönnemaa T, Laine H, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Nuutila P, Yki-Järvinen H. Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM // *Diabetologia*. – 1998. – Vol. 41(5). – P. 555-559.
41. Wennberg P., Nordström P., Lorentzon R., Lerner U.H., Lorentzon M. TNF-alpha gene polymorphism and plasma TNF-alpha levels are related to lumbar spine bone area in healthy female Caucasian adolescents // *Eur. J. Endocrinol.* – 2002. – V. 146(5). – P. 629-634.
42. Wu W, Wang M, Sun Z, Wang X, Miao J, Zheng Z. The predictive value of TNF-alpha and IL-6 and the incidence of macrovascular complications in patients with type 2 diabetes // *Acta Diabetol.* – 2010. – Vol. 21. – [E. pub ahead of print].
43. Xiao P., Liu P.Y., Lu Y., Guo Y.F. et al. Association tests of interleukin-6 (IL-6) and type II tumor necrosis factor receptor (TNFR2) genes with bone mineral density in Caucasians using a re-sampling approach // *Hum. Genet.* 2005. – V. 117(4). – P. 340-348.
44. Yamada Y. Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis // *Pharmacogenetics*. – 2001. - V.11 (9). – P. 765-771.
45. Zhang D., Zheng H., Zhou Y., Tang X., Yu B., Li J. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer // *B MC Cancer*. - 2007. - Vol. 7. - P. 45-51.